

Resistencia a la peroxidación lipídica en organelas de ovario e hígado de gallinas ponedoras Brown Nick jóvenes

Reboredo, G.R.; Gutiérrez, A.M.; Piergiacomí, V.A.; Zeinsteger, P.A.; Palacios, A.

Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata–UNLP (Argentina) y Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP (Argentina).

E-mail: petzeins@hotmail.com.

Resumen

Reboredo, G.R.; Gutiérrez, A.M.; Piergiacomí, V.A.; Zeinsteger, P.A.; Palacios, A.: Resistencia a la peroxidación lipídica en organelas de ovario e hígado de gallinas ponedoras Brown Nick jóvenes. *Rev. vet.* 21: 2, 86–92, 2010. Estudios previos han demostrado que las aves presentan un bajo grado de insaturación de los ácidos grasos (AG) cuando se las compara con mamíferos de similar tamaño corporal. El objetivo de este estudio fue evaluar la composición de los AG y la sensibilidad a la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas obtenidos de ovario e hígado de gallinas ponedoras jóvenes. La composición de AG de las mitocondrias y microsomas se obtuvo por cromatografía gaseosa. La lipoperoxidación (LP) fue cuantificada por quimioluminiscencia. En mitocondrias y microsomas de ambos tejidos predominaron los AG C16:0 y C18:0, los AG no saturados más relevantes fueron C18:1 y C18:2. En las mitocondrias de ambos órganos no se halló C22:6. La emisión luminica originada por las organelas de ambos tejidos no fue estadísticamente significativa cuando se compararon las muestras controles y peroxidadas. El perfil de AG no fue modificado por la LP. Estos resultados indican que en las organelas de ovario e hígado de las gallinas predominan los ácidos grasos no saturados con bajo número de dobles ligaduras. Esto y otros factores podrían ser la causa de la baja sensibilidad a la LP observada en estos órganos, protegiéndolos contra el daño oxidativo.

Palabras clave: gallina ponedora, ácidos grasos, peroxidación lipídica, hígado, ovario.

Abstract

Reboredo, G.R.; Gutiérrez, A.M.; Piergiacomí, V.A.; Zeinsteger, P.A.; Palacios, A.: Resistance to lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from ovary and liver of Brown Nick laying hens. *Rev. vet.* 21: 2, 86–92, 2010. Previous studies have demonstrated that birds have low degree of unsaturation of fatty acids (FA), when compared to mammals of similar body size. The aim of this study was to evaluate the FA composition and lipid peroxidation sensitivity of mitochondria and microsomes obtained from ovary and liver of young poultry hens. The FA composition of mitochondria and microsomes was obtained by gas chromatography. Lipid peroxidation (LP) was quantified by means of chemiluminescence. In mitochondria and microsomes of both organs C16:0 and C18:0 were the most common AG, while C18:1 and C18:2 were the most abundant unsaturated FA. In mitochondria of both organs, C22:6 was absent. Light emission originated from organelles of both tissues was not statistically different when comparing controls and peroxidized. The AG profiles were not modified after LP. Our results indicate that in mitochondria and microsomes of ovary and liver of chicken prevailed unsaturated fatty acids with low number of double bonds. This and other factors might be the cause of the low sensitivity to LP observed in these organs, protecting them against oxidative damage.

Key words: laying hen, fatty acids, lipid peroxidation, liver, ovary.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos polinosaturados constituyentes de fosfolípidos de membrana celular son excelentes sustratos para la peroxidación. Es bien sabido que los cambios que pueden sufrir los lípidos afectan las funciones de la membrana²⁶. Los microsomas y las mitocondrias obtenidas de tejidos de mamíferos^{24,25} y de diferentes especies de aves^{2,29} son organelas susceptibles a la lipoperoxidación. La cantidad de ácidos grasos y el nivel de antioxidantes hallados en las membranas biológicas varían en las distintas especies y entre distintos tejidos de una misma especie. Esta variación las hace más o menos vulnerables a la peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica es un ensayo que se utiliza para medir el daño inducido por radicales libres^{33,34}. La peroxidación lipídica no enzimática y la formación de peróxidos lipídicos pueden ser iniciados por el agregado de ascorbato en presencia de oxígeno y Fe^{3+} o Fe^{2+} a preparaciones de tejido tales como homogenatos, mitocondrias, microsomas y núcleos de diferentes tejidos y especies¹⁷.

Trabajos previos demuestran que el grado de no saturación de los ácidos grasos, la sensibilidad a la peroxidación lipídica y la producción de especies reactivas del oxígeno de mitocondrias de hígado, pulmón y cerebro es menor en palomas que en ratas, observándose en cerebro la mayor diferencia^{2,26}. Estudios con corazón de “canario” (*Serinus canarius*) y “cotorrita australiana” (*Melopsittacus undulatus*) permitieron observar en el perfil de los ácidos grasos, un mayor porcentaje de AG con menor número de dobles ligaduras que los hallados en ratones³⁰. Resultados similares se obtuvieron al comparar mitocondrias de hígado de paloma y de rata²⁶. En ensayos anteriores se observó una estrecha relación entre la sensibilidad del tejido a la peroxidación lipídica *in vitro* y el contenido de ácidos grasos polinosaturados en mitocondrias de hígado, corazón y cerebro de ganso⁸.

Las aves tienen tasas metabólicas, temperatura corporal y niveles de glucosa en sangre superiores a las de los mamíferos con similar tamaño corporal^{2,4,12,14}, estas son características asociadas al envejecimiento prematuro¹³. Sin embargo, la inmensa mayoría de las aves son animales longevos. Los datos experimentales son consistentes con la idea que las aves poseen buena resistencia al daño oxidativo producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y que poseen una elevada actividad antioxidante en las membranas mitocondriales, cuando se las compara con la de los mamíferos^{1,2,3,11,23,28,31}. Los ácidos grasos no saturados son más susceptibles al daño inducido por ROS y la sensibilidad a la peroxidación lipídica aumenta en función del número de dobles enlaces^{22,27}.

Trabajos efectuados por otros investigadores^{26,28} y recientes investigaciones realizadas en nuestro laboratorio^{7–10} demuestran que las membranas mitocondriales de diferentes tejidos de aves poseen ácidos grasos con bajo grado de no saturación y son más resistentes a

la peroxidación lipídica que las de mamíferos de similar tamaño corporal. También fueron obtenidos resultados similares, cuando se compararon mitocondrias de corazón de paloma y de rata^{7,26}. Sin embargo, es poca la información existente sobre la peroxidación lipídica en hígado y ovario de gallinas ponedoras. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo de este estudio fue analizar la composición de ácidos grasos y la sensibilidad a la peroxidación lipídica en mitocondrias y microsomas de hígado y ovario de gallinas ponedoras jóvenes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: se utilizaron gallinas ponedoras jóvenes de 4 meses de edad ($n = 9$), con un peso de 1.185 ± 17 g, provenientes de la granja de la Escuela Agropecuaria N° 1 de Lincoln, Provincia de Buenos Aires (Argentina). Los animales estaban en el período de prepostura, fueron alimentados con una mezcla comercial de pellets y semillas y agua *ad libitum*. La composición de los ácidos grasos de la dieta fue la siguiente: 17% de ácido palmítico C16:0, 23,21% de ácido esteárico C18:0, 53,96% de ácido oleico C18:1 n9, 0,80% de ácido linoleico C18:2 n6 y 0,24% de ácido linolénico C18:3 n3. Las aves fueron sacrificadas por decapitación y los ovarios e hígados rápidamente removidos. El protocolo de tratamiento de los animales fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP.

Químicos: Sepharosa 4B fue obtenida de Pharmacia Fine Chemicals Inc. Piscataway, NJ, USA. Albúmina sérica bovina (fracción V): Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japón. Estándares de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos de Nu Check Prep. Inc. Elysian, MN, USA. Sacarosa: J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA. 2,6-di-*t*-butil-*p*-cresol (BHT); Fenil metil sulfonil fluoruro (PMFS) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Reactivo de Folin-Ciocalteu y ácido tricloroacético; ácido ascórbico y el complejo trifluoruro de boro-metanol de Merck (Darmstadt, Germany). Cloroformo; Etanol absoluto; Éter de Petróleo; Metanol (grado analítico): fueron adquiridos en Merck Química Argentina.

Preparación de mitocondrias y microsomas de hígado y ovario: el hígado y el ovario de las aves fueron pesados individualmente (peso húmedo), cortados y lavados con solución fisiológica (NaCl 0,15 M). Los tejidos fueron resuspendidos en solución 0,25 M de sacarosa, 0,01 M Tris HCl pH 7,4, 0,1 mM PMSF (3 ml por g de tejido) y homogeneizados usando un homogenizador Potter-Elvehjem (Cole Palmer, Vernon Hills, IL, USA). El homogeneizado se centrifugó a $10.000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$, los pellets se descartaron y se centrifugó nuevamente a $20.000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$. De esta forma se obtuvieron los sobrenadantes postmitocondriales y las mitocondrias. Todas las operaciones se realizaron a 4°C . Se aplicó el sobrenadante postmitocondrial a columnas de Sepha-

rosa 4B (buffer de elución Tris HCl 0,01M, pH 7.4) para separar material particulado (microsomas) de la fracción soluble (citósol).

Peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas: la peroxidación lipídica no enzimática ascorbato- Fe^{++} dependiente se analizó incubando las mitocondrias y los microsomas de hígado y ovario (1 mg de proteína) en buffer fosfato 0,05 M, pH 7,4 a 37°C, volumen final 1 ml. La reacción de lipoperoxidación se inició mediante el agregado de ascorbato (concentración final 0,4 mM). El buffer fosfato contiene suficiente cantidad de hierro para proveer el hierro ferroso o férrico necesario para la peroxidación lipídica (la concentración final en la incubación fue de 2.15 μM)³⁵. En todos los casos se realizó en forma simultánea un blanco sin ascorbato considerado como control. El proceso fue cuantificado por quimioluminiscencia (emisión lumínica) empleando un contador de centelleo líquido Packard 1900 TR, (Meriden, CT, USA) provisto de un programa de quimioluminiscencia³⁷. Las lecturas de quimioluminiscencia (cpm) se realizaron cada 10 min durante un periodo de 120 min.

Análisis de ácidos grasos: los lípidos fueron extraídos con cloroformo-metanol (2:1, v/v) conteniendo 0.01% de BHT como antioxidante⁵. Los ácidos grasos totales fueron transmetilados con F_3B al 20% en meta-

no a 65°C durante 180 min. Los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron analizados en un cromatógrafo gaseoso GC 14 A (Shimadzu-Kioto, Japón) equipado con una columna de 1,80 m x 4 mm i.d. GP 10% DEGS-PS en 80/100 Supelcoport. Se utilizó nitrógeno como gas carrier. Las temperaturas del inyector y del detector fueron mantenidas a 250°C y la de la columna a 200°C durante 60 min. Los picos correspondientes a los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares. La composición total fue expresada como el porcentaje de área de los ácidos grasos totales.

Determinación de proteínas: Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry *et al.* (1951)²⁰.

Cálculos:

- Ácidos grasos saturados = $\sum \% (16:0 + 18:0)$
- Ácidos grasos monoetilénicos = $\sum \% (16:1 + 18:1)$
- Ácidos grasos polinosaturados = $\sum \% (18:2 + 18:3 + 20:4)$
- Total de ácidos grasos no saturados = $\sum \% (\text{monoetilénicos} + \text{polinosaturados})$
- Índice de no saturación (UI) = $\sum \text{del área \% de ácidos grasos no saturados} \times \text{número de dobles ligaduras de cada ácido}$ ¹⁹.

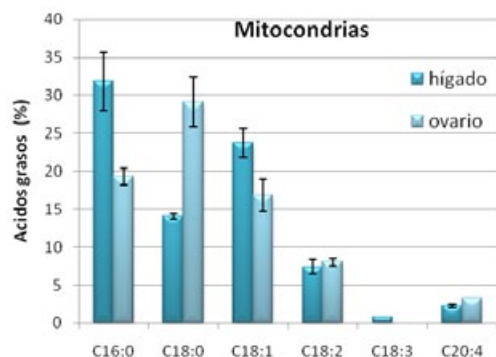


Figura 1. Composición de los ácidos grasos de las mitocondrias de hígado y ovario.

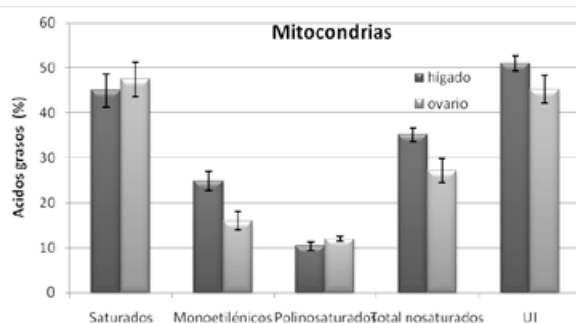


Figura 2. Índices generales de los ácidos grasos de las mitocondrias de hígado y ovario.

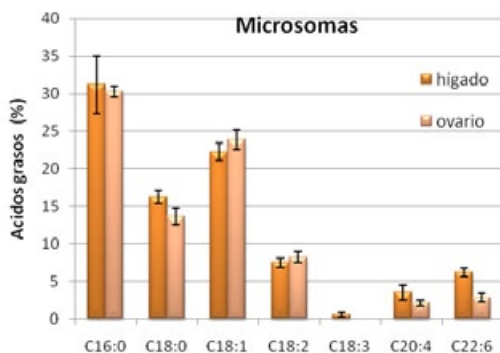


Figura 3. Composición de los ácidos grasos de microsomas de hígado y ovario.

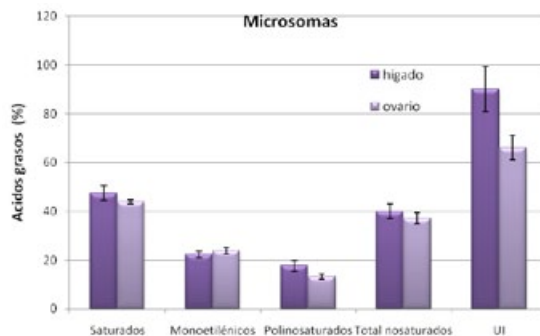


Figura 4. Índices generales de los ácidos grasos de microsomas de hígado y ovario.

Tabla 1. Composición de los ácidos grasos de mitocondrias y microsomas del hígado.

ácidos grasos	hígado (%)			
	mitocondrias		microsomas	
	control	peroxidado	control	peroxidado
C16:0	34,27±1,29	30,64±0,45	28,18±0,76	28,25±5,80
C16:1 n7	–	–	–	–
C18:0	11,97±1,80	12,61±0,68	13,80±2,12	15,65±0,74
C18:1 n9	26,33±1,19	28,14±2,50	22,11±1,95	25,50±0,74
C18:2 n6	8,11±0,72	7,80±1,27	6,40±0,85	7,95±1,29
C18:3 n3	0,69±0,09	0,66±0,03	0,71±0,15	0,55±0,22
C20:4 n6	2,31±0,76	3,06±0,29	2,48±0,38	1,94±0,49
C22:6 n3	–	–	5,50±0,67	4,82±0,41
saturados	46,24±0,76	43,24±1,20	41,98±1,89	43,89±6,33
monoetilénicos	26,33±1,19	28,14±1,50	22,11±1,95	25,50±3,38
polinosaturados	11,11±0,93	11,53±0,94	15,09±1,15	15,27±1,57
total de no saturados	37,44±1,00	39,67±2,97	37,20±2,94	40,77±4,23
sat / no saturados	1,24±0,01	1,10±0,08	1,13±0,07	1,08±0,14
índice no–satur (UI)	53,86±1,89	57,99±3,19	79,95±6,42	79,75±5,57

Tabla 2. Composición de los ácidos grasos de mitocondrias y microsomas del ovario.

ácidos grasos	ovario (%)			
	mitocondrias		microsomas	
	control	peroxidado	control	peroxidado
C16:0	15,91±3,94	16,62±0,70	33,01±5,63	31,76±2,41
C16:1 n7	–	–	–	–
C18:0	33,58±3,27	32,27±2,69	13,36±1,95	13,78±1,59
C18:1 n9	16,34±0,47	16,24±1,50	23,83±0,50	23,16±0,50
C18:2 n6	6,09±0,77	6,16±1,50	7,96±0,44	7,48±1,00
C18:3 n3	–	–	–	–
C20:4 n6	3,83±0,13	4,10±0,43	2,58±0,31	2,22±0,11
C22:6 n3	–	–	2,07±0,14	2,45±0,40
saturados	49,49±5,66	48,88±1,98	46,37±3,91	45,55±3,73
monoetilénicos	16,34±0,47	16,24±1,50	23,83±0,50	23,16±0,50
polinosaturados	9,93±0,70	10,26±1,06	12,61±0,31	12,15±0,94
total de no saturados	26,27±0,86	26,50±0,96	36,5±0,59	35,30±1,35
sat / no saturados	1,88±0,16	1,85±0,13	1,27±0,12	1,30±0,15
índice no–satur (UI)	43,86±1,34	44,96±0,89	62,49±0,89	61,68±2,92

Análisis estadístico: los resultados fueron expresados como el promedio ± SD de tres experimentos independientes. Los datos fueron evaluados estadísticamente por el método test “t” de Student.

RESULTADOS

Análisis de la composición de ácidos grasos obtenida por cromatografía gaseosa: en mitocondrias y microsomas de hígado y ovario el porcentaje de ácidos grasos saturados de cadena larga fue de aproximadamente un 45% del total de los ácidos grasos, con prevalencia de ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0) (Tablas 1 y 2). En mitocondrias, el ácido palmítico fue 1,7 veces mayor en hígado que en ovario, y el ácido esteárico fue 2,16 veces mayor en ovario que en hígado. En microsomas de hígado y de ovario no se observaron diferencias significativas entre los ácidos grasos saturados mencionados. En mitocondrias y microsomas de hígado y ovario el porcentaje de ácidos grasos no saturados fue de aproximadamente 35%. Dentro de los mismos el contenido de ácidos grasos monoetilénicos de mitocondrias de hígado fue de 1.6 veces mayor que en las mitocondrias de ovario; en los microsomas de ambos órganos no se hallaron diferencias significativas entre los ácidos grasos mencionados.

El porcentaje de ácidos grasos poli-etilénicos de mitocondrias y microsomas fue de aproximadamente 11% en hígado y ovario (Figuras 1, 2, 3 y 4). En ambas organelas de los tejidos estudiados, los ácidos grasos no saturados predominantes fueron el oleico (C18:1n9) y el linoleico (C18:2n6), caracterizados por poseer bajo número de dobles ligaduras (Figuras 5, 6, 7 y 8). El porcentaje de ácido docosa-hexaenoico (C22:6n3) de los microsomas de hígado fue aproximadamente 2.2 veces mayor que el de ovario, no registrándose en mitocondrias (Figuras 1 y 3). Las mitocondrias de hígado y ovario presentaron similar índice



Figura 5. Porcentaje de ácidos grasos polinosaturados de mitocondrias de hígado y ovario.

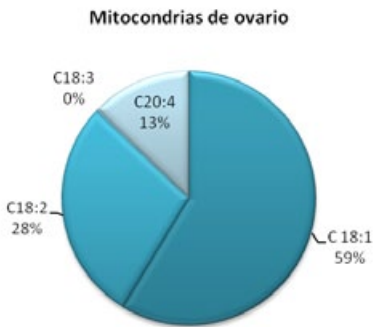


Figura 6. Porcentaje de ácidos grasos polinosaturados de mitocondrias de hígado y ovario

de no saturación (UI), mientras que en los microsomas de hígado el UI fue aproximadamente 1.4 veces superior al de ovario (Figuras 2 y 4).

Quimioluminiscencia de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado y ovario: durante los ensayos de peroxidación lipídica *in vitro*, no se observaron diferencias significativas en los valores de quimioluminiscencia (cpm) en las muestras control y peroxidadas de hígado y ovario. El perfil de ácidos grasos y el UI no fueron modificados durante este proceso (Tablas 1 y 2, Figura 9).

DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado que el daño producido por los radicales libres y la peroxidación lipídica aumentan en función del grado de no saturación que presentan los ácidos grasos constituyentes de los fosfolípidos de las membranas celulares. Los ácidos grasos polinsaturados n-3 son más susceptibles a la peroxidación que los polinsaturados n-6. El C22:6n3 es 320 veces más susceptible a la peroxidación que el 18:1n9^{15,16}. Además, en varios trabajos se ha demostrado que el grado de no saturación de los ácidos grasos y la sensibilidad a la peroxidación de los lípidos de las mitocondrias de hígado, corazón y cerebro de las aves es menor que la de los mamíferos^{2,18,26,29}.

Aquí se describe por primera vez la composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas obtenidos de hígado y ovario de gallinas ponedoras jóvenes del período previo al comienzo de la postura (recría). En las organelas de los tejidos estudiados predominaron los ácidos grasos con bajo grado de no saturación, en coincidencia con resultados de estudios anteriores^{9,10,28}. El total de ácidos grasos no saturados fue similar en las organelas de los tejidos examinados, pero la contribución porcentual en el perfil lipídico de cada ácido graso fue diferente. Las variaciones observadas en el perfil de los ácidos grasos de mitocondrias y microsomas de los tejidos estudiados podrían estar en correlación con la regulación homeostática de cada órgano^{21,32}.

El control del grado de no saturación de los lípidos de membrana se ha atribuido a una retroalimentación negativa de genes de transcripción de las desaturasas dependiente de la composición lipídica^{21,36} y a la modulación de desaturasas por el estado metabólico–hormonal⁶.

Las organelas de hígado y ovario de las gallinas ponedoras estudiadas en este trabajo fueron poco sensibles a la peroxidación lipídica, sus valores de quimioluminiscencia no mostraron diferencias significativas cuando se compararon las muestras control versus las peroxidadas. Estos resultados indican que no existe una disminución en el contenido de ácidos grasos no saturados, sino una redistribución entre los diferentes

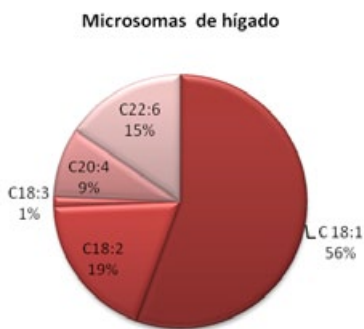


Figura 7. Porcentaje de ácidos grasos polinsaturados de microsomas de hígado y ovario.



Figura 8. Porcentaje de ácidos grasos polinsaturados de microsomas de hígado y ovario.

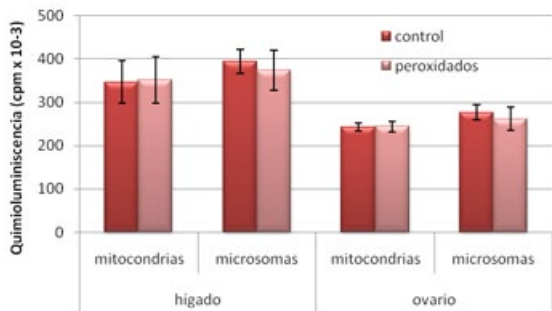


Figura 9. Total de quimioluminiscencia producida en mitocondrias y microsomas de hígado y ovario, expresados como cpm/mg de proteínas.

tipos de ácidos grasos no saturados, intercambiándose los ácidos grasos altamente no saturados por aquellos ácidos grasos menos saturados. La consecuencia de esta distribución es un UI bajo y una disminución de la sensibilidad a la peroxidación lipídica. Los ácidos grasos C18:1n9 y C18:2n6, presentes en las mitocondrias y microsomas de ovario e hígado de las gallinas ponedoras jóvenes, podría permitir una disminución en el número de dobles ligaduras de las membranas mitocondriales sin provocar grandes cambios en la fluidez de estas últimas, una propiedad necesaria para la función de las proteínas de membrana.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Sr. Gabriel Dacurso, productor, y al Ing. Alejandro E. Reboredo, Director de la Escuela Agropecuaria N° 1 de Lincoln por la provisión de los animales para experimentación y el apoyo para con este trabajo.

REFERENCIAS

1. **Austad SN.** 1997. Birds as models of aging in biomedical research. *J Int Leag Ag Rheum (ILAR)* 38: 137–141.
2. **Barja G, Cadenas S, Rojas C, Pérez R, López M.** 1994. Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic Res* 21: 317–328.
3. **Barja G.** 1998. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann N Y Acad Sci* 854: 224–238.
4. **Finch CA.** 1990. Longevity, senescence and the genome. *Ed University of Chicago Press, Chicago (USA)*, p. 248.
5. **Folch J, Lees N, Sloane GA.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509.
6. **Gueraud F, Paris A.** 1997. Hepatic microsomal membrane lipidic composition and growth hormone effect in adult male rat: evidence for a 'feminization' process of total phospho-lipid fatty acid pattern. *Biochim Biophys Acta* 1329: 97–110.
7. **Gutiérrez AM, Reboredo GR, Arcemis CJ, Catalá A.** 2000. Non-enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria isolated from liver and heart of pigeon and rat. *Int J Biochem Cell Biochem* 32: 73–79.
8. **Gutiérrez AM, Reboredo GR, Mosca SM, Catalá A.** 2004. Fatty acid composition and lipid peroxidation induced by ascorbate-Fe²⁺ in different organs of goose (*Anser anser*). *Comp Biochem Physiol C* 137: 123–132.
9. **Gutiérrez AM, Reboredo GR, Mosca SM, Catalá A.** 2006. A low degree of fatty acid unsaturation leads to high resistance to lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of different organs of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Mol Cell Biochem* 282: 109–115.
10. **Gutiérrez AM, Reboredo GR, Mosca SM, Catalá A.** 2007. Non-enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from liver, heart and brain of the bird *Lonchura striata*: relationship with fatty acid composition. *Comp Biochem & Physiol A* 146: 415–421.
11. **Herrero A, Barja G.** 1998. H₂O₂ production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mech Ageing Dev* 103: 133–146.
12. **Holmes DJ, Austad SN.** 1995. Birds as animal-models for the comparative biology of aging. A prospectus. *J Gerontol Ser A* 50: B59–B66.
13. **Holmes DJ, Fluckiger R, Austad SN.** 2001. Comparative biology of aging in birds: an update. *Exp Gerontol* 36: 869–883.
14. **Holmes DJ, Ottinger MA.** 2003. Birds as long-lived animal models for the study of aging. *Exp Gerontol* 38: 1365–1375.
15. **Hulbert AJ.** 2005. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 234: 277–288.
16. **Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA.** 2007. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev* 87: 1175–1213.
17. **Jakobsson-Borin A, Aberg F, Daliner G.** 1994. Lipid peroxidation of microsomal and mitochondrial membranes extracted with n-pentane and reconstituted with ubiquinol, dolichol and cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1213: 159–166.
18. **Ku HH, Sohal RS.** 1993. Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and antioxidant defenses between rat and pigeon, possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mech Ageing Dev* 72: 67–76.
19. **Llanillo M, Sanchez-Yague J, Checa A, Martín-Valmaseda EM, Felipe A.** 1995. Phospholipid and fatty acid composition in stored sheep erythrocytes of different densities. *Exp Hematol* 23: 258–264.
20. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
21. **Maresca B, Cossins AR.** 1993. Fatty acid feedback and fluidity. *Nature* 365: 606–607.
22. **North JA, Spector AA, Buettner GR.** 1994. Cell fatty acid composition affects free radical formation during lipid peroxidation. *Am J Physiol* 269: R1213–R1224.
23. **Ogburn CE, Carlberg K, Ottinger MA, Holmes DJ, Martín GM, Austad SN.** 2001. Exceptional cellular resistance to oxidative damage in long-lived birds requires active gene expression. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: B468–B474.
24. **Palacios A, Piergiacomi V.** 2005. Effect of conjugated linoleic acid on non enzymatic lipid peroxidation of mitochondria obtained from different tissues. *Rev Vet (Argentina)* 16: 3–8.
25. **Palacios A, Piergiacomi V.** 2008. Lipid peroxidation of microsomes obtained from rat liver and kidney: effect of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid isomer. *An Vet (Murcia)* 24: 63–73.
26. **Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Pérez R, López M, Barja G.** 1996. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mech Ageing Dev* 86: 53–66.
27. **Pamplona R, Portero-Otín M, Riba D, Ruiz C, Prat J, Bellmunt MJ, Barja G.** 1998. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J Lipid Res* 39: 1989–1994.
28. **Pamplona R, Portero-Otín M, Ledo, DF, Gredilla R, Barja G.** 1999. Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging Clin Exp Res* 11: 44–49.
29. **Pamplona R, Portero-Otín M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A, Barja G.** 1999. A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech Ageing Dev* 106: 283–296.

30. **Pamplona R, Portero-Otin M, Ledo DF, Gredilla R, Barja G.** 1999. Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging Clin Exp Res* 11: 44–49.
31. **Perez-Campo R, López M, Cadenas S, Rojas C, Barja G.** 1998. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol B* 168: 149–158.
32. **Salem N, Litman JR, Kim HY, Gawrisch K.** 2001. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res Rev* 6: 189–210.
33. **Sevanian A, Hochstein P.** 1985. Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr* 5: 365–390.
34. **Svingen BA, Buege JA, O'Neal FO, Aust SD.** 1979. The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 254: 5892–5899.
35. **Tadolini B, Cabrini L, Menna C, Pinna GG, Hakim G.** 1997. Iron [III] stimulation of lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation. *Free Radical Res* 27: 563–576.
36. **Vigh L, Los DA, Horvath I, Muirata N.** 1993. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 90: 9090–9094.
37. **Wright JR, Rumbaugh RC, Colby HD, Miles PR.** 1979. The relationship between chemiluminescence and lipid peroxidation in rat hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys* 192: 344–351.